

⑫ 公開特許公報(A) 平2-2385

⑤ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)1月8日

C 12 P 21/00

C

6712-4B

8717-4B

7421-4B

C 12 N 15/00

1/16

A

K※

審査請求 有 請求項の数 10 (全10頁)

⑭ 発明の名称 蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の製法

⑯ 特 類 昭64-166

⑰ 出 願 昭64(1989)1月5日

優先権主張 ⑱ 1988年1月5日 ⑲ 西ドイツ(DE) ⑳ P3800134.9

⑲ 発 明 者 デイター・ハインリッヒ・ヴォルフ ドイツ連邦共和国グンデルフィンゲン・リンデンシュトラッセ 61

⑳ 出 願 人 ベーリンガー・マンハイム・ゲゼルシャフト・ミット・ベシュレンクテル・ハフツング ドイツ連邦共和国マンハイム31・ザントホーフエルストラッセ 116

㉑ 代 理 人 弁理士 矢野 敏雄 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1 発明の名称

蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の製法

2 特許請求の範囲

1. 真核生物の宿主細胞を、所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体 DNA 分子で形質転換し、細胞を培養し、かつ発現後に遺伝子生産物を分離することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を製造する方法において、宿主細胞として、プロテアーゼ A 及び B が欠損している酵母菌株を使用することを特徴とする、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の製法。

2. 付加的に、該酵母菌株はプロテアーゼ D が欠損している請求項 1 記載の方法。

3. 付加的に、該酵母菌株はカルボキシペプチダーゼ Y 及び/又は S が欠損している請求項 1 又は 2 記載の方法。

4. 酵母菌株 ABYSD - 11, DSM 4322 を使用する請求項 3 記載の方法。

5. プロテアーゼ欠損酵母菌株を他の栄養要求性及び/又は薬剤感受性酵母菌株と交雑させ、孢子形成させかつ生成したハイブリッド菌株から栄養要求性及び/又は薬剤感受性を介して選択した後で、少なくともプロテアーゼ A 及び B が欠損しておりかつ親株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性の少なくとも一方を有する酵母菌株を分離し、かつこのハイブリッド菌株を宿主細胞として使用する請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項記載の方法。

6. 酵母菌株 ABYSD - 11, DSM 4322 を菌株 YCY 2824 - 1A, DSM 4317 又は DBY 746, DSM 4316 と交雑させ、プロテアーゼ A, B 及びカルボキシペプチダーゼ Y 及び S 並びに場合によりプロテアーゼ D が欠損しておりかつ親株のウラシル-, リジン- 及びマルトース有効化栄養要求性, ロイシン- 及びトリプトファン- 又はロイシン-, ウラシル- 及びヒステジン栄養要求性を有する菌株を分離し、かつそれを宿主細胞として

使用する請求項5記載の方法。

7. 付加的に、宿主細胞の栄養要求性及び／又は薬剤感受性を相補う遺伝子1種以上を含有する組換え体DNA分子を使用する請求項5又は6記載の方法。

8. 組換え体DNA分子として統合ベクター又は統合性DNAフラグメントを使用する請求項1から7までのいずれか1項記載の方法。

9. 組換え体DNA分子が高いコピー数で細胞中に産出する酵母プラスミドである請求項8記載の方法。

10. α-グルコシダーゼ(EI)を製造する請求項1から9までのいずれか1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、遺伝子工学的な方法で、真核生物の宿主細胞を、所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体DNA分子で形質転換し、その細胞を増殖し、かつ遺伝子生産物を公知方法で単離することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産

物(フラクタイル ボディ: refractile bodies)として生じる。多くの真核生物の蛋白質は、E. コリ中では不溶性で発現され、S. セレビシエ中では溶性かつ活性で形成される。["Biotechnology and Genetic Engineering Reviews", 3, 377~416頁(1985年)]。とりわけこのことは、酵母が典型的な真核生物の翻訳後修飾系、例えば蛋白質の折りたたみ、蛋白質成熟、グリコシル化及びアセチル化を介して分泌可能でありかつポリペプチド及び蛋白質中のジスルフィド架橋の形成を可能にすることにより惹起されるのであろう。更に、酵母は病原性ではなくかつE. コリとは異なり毒素及び発熱原性細胞壁成分を含有していない。

酵母は人間の最も古い培養微生物の一つである。今でも主としてアルコール酸酵(ワイン、ビール等)に及びドク製品の「ベーキング助剤(Backbifle)」として使われている。それと同時に、酵母は例えばNAD、ATP及びグルタマートのような低分子物質及び例えばDNA、RNA

物を製造する方法に関する。

従来の技術

今日、臨床化学的パラメータの測定は大規模に酵素法で行なわれる。そのために必要な試薬の製造に使われる酵素は植物又は動物に由来する種々の原料からあるいは微生物から得られる。

酵素及び他の蛋白質の製造に當つて、微生物がますます重要になつてきている。それというのも微生物だけが酸酵により任意の量で使用可能であり、従つて多量の蛋白質の単離が可能だからである。特に重要なのは周知のように例えばサツカロミセス セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のような酵母である。それというのもこの生体中では蛋白質の相同発現が真核生物の例えば治療に重要な蛋白質の非相同発現と全く同様に可能である。これに対して、最も頻繁に使われる宿主生体のE. コリ中では多数の非相同発現蛋白質は相同系で発現されるその天然物とは異なりかつ生物学的に活性ではないか、あるいは不溶性の不活性蛋白質製剤物("レ

及びとりわけ酵素、例えばアルコール-デヒドロゲナーゼ、アルデヒド-デヒドロゲナーゼ、アセチル-CoA-シンテターゼ、α-グルコシダーゼ、グリセリンアルデヒド-3-ホスファートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-ホスファート-デヒドロゲナーゼ及びヘキソキナーゼのような高分子物質を単離するための低廉な原料として工業的に重要である。酵母は簡単に培養することができかつ長年の経験から工業的規模で簡単に酸酵させることができる。下等な真核生物に含まれる単細胞生物の酵母は真核生物の典型的な特徴を有するが、遺伝学的実験及び遺伝学的操作に使い易く、特に組換えDNA工学的な点で宿主生物として好適であり、つまり生物学的に活性なポリペプチド及び蛋白質の相同及び非相同発現に好適である。

しかしながらたいいていの場合、酵母中で蛋白質を発現する際に、形成される蛋白質の量が不十分である。しばしば、形成された微生物のバイオマスが上昇するにもかかわらず、成長の定

常早期に到達後、所望の蛋白質の特異的活性が定常期の間に低下するのが認められる。これは、とりわけ宿主特異的プロテアーゼによる、形成された蛋白質に対する蛋白質分解作用に起因している。

発明が解決しようとする課題

それ故、本発明の課題は、遺伝子工学的方法で、発育の定常期でも蛋白質を形成することができ、安定に培養することができ、それ故に酵母の収率を高めることのできる、蛋白質の製法を開示することである。

課題を解決するための手段

本発明により、この課題は、真核生物の宿主細胞を所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体 DNA 分子で形質転換し、細胞を培養し、かつ発現後に遺伝子生産物を単離することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を製造する方法において、宿主細胞として、プロテアーゼ A 及び B が欠損している酵母株を使用することにより解決される。

ヒカルボキシペプチダーゼ Y 及び B が欠損している。更に、この宿主株はアザニン、ヒステジン及びリジンの生合成において栄養要求性を有する。栄養要求性とは、微生物（細菌又は酵母の変異株）が例えばアミノ酸のような一定の生育因子を簡単な前駆体から合成し得る能力を持つていないことを表わす。相応する野生型株とは反対に、栄養要求変異株は所謂最少培地では生育しない。その代りに、自身で合成することのできない生育に必要な成分を含有する完全培地を必要とする。微生物は1種のあるいはまた数種の生育因子に対して栄養要求性であつてよい〔B. L. Winnacker 著、"Gene und Klon", 付録 C, Verlag Chemie 出版（1985年）〕。

本発明の他の優れた実施形では、前記のプロテアーゼ欠損酵母株を他の栄養要求性及び／又は薬剤感受性酵母株と交雑し、孢子形成後、栄養要求性及び／又は感受性を介して生成ハイブリッド株から選択することにより、少なくともプロテアーゼ A 及び B が欠損しておりかつ親株

付加的に、酵母株がプロテアーゼ D が欠損していると優れている。

他の優れた実施形では、プロテアーゼ A、B 及び場合により D が欠損していることに加えて、カルボキシペプチダーゼ Y 及び B の少なくとも一方が欠損している酵母株を使用する。本明細書におけるプロテアーゼ及びヒカルボキシペプチダーゼの表記の仕方は"酵母 (Yeast)", 1 巻, 139~154 頁（1985年）に相応する。

本発明方法で、このようなプロテアーゼ欠損酵母株を使用することにより、蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物を酵母中で高い収率で製造することができ、その後に著しく長い酸酵時間でもあるいは引続いて行なう公知方法による単離の際にも蛋白質分解作用、従つて蛋白質の失活化は起らない。

本発明の特に優れた実施形では、宿主細胞として酵母株 ABYSD-11, DSM 4322 を使用する。この宿主株はプロテアーゼ A、B、D 及

の栄養要求性及び／又は薬剤感受性の少なくとも一方を有する酵母株を分離し、かつこのハイブリッド株を宿主細胞として使用する。

薬剤感受性とは、一定の薬剤、例えばメトトレキサート、クロラムフェニコール及びゲンタマイシン誘導体 G 4.18 を含有する培地中では生育しない微生物の特性を表わす。微生物にこれらの薬剤に対する抵抗性を付与する遺伝子を含有する組換え体 DNA（サヒドロフロレートリダクターゼ, DHFR; クロラムフェニコール-アセチル-トランスフェラーゼ, CAT; トランスポゾン Ta 601 コード化アミノグリコシド-ホスホトランスフェラーゼ等）で微生物を形質転換後に初めて微生物は培地中で生育できる。例えば、交雑及び孢子形成は、シャーマン及びその他共著 (Sherman et al.), "メソズ・イン・イースト・ジエネティクス (Methods in Yeast Genetics)"〔Cold Spring Harbor Laboratory 出版, Cold Spring Harbor, New York 在（1984年）〕と同様にして実施す

ることができる。本発明の特に優れた実施形では、酵母株 ABYSD-11, DSM 4322 (*a*, *pra* 1, *prb* 1, *prc* 1, *prd* 1, *cps* 1, *ade* *lys* *his* 7) を、欠陥マルターゼ構造遺伝子並びにウラシル-及びヒスタジン生合成における栄養要求性もしくはヒスタジン-, ロイシン-, ウラシル-及びトリプトファン生合成における栄養要求性を有する酵母株 TCY 2824-1A (*α* *mal* 18-Δ *ura* 3-52 *his* 4), DSM 4317 又は DBY 746, DSM 4316 (*α* *his* 3-Δ1 *leu* 2-3 *leu* 2-112 *ura* 3-52 *trp* 1-289a) と交雑させる。その後、有利に、プロテアーゼ A, B 及び場合により D 並びにカルボキシペプチダーゼ Y 及び B が欠損しておりかつ付加的に親株の少なくとも1種もしくは数種の栄養要求性、例えばウラシル-, リジン-及びマルターゼ有効化 (*Verwertung*) 栄養要求性又はロイシン-及びトリプトファン栄養要求性あるいはロイシン-, ウラシル-及びヒスタジン栄養要求性を有するハ

れ故、所望の蛋白質の遺伝子を含有する組換え体 DNA が醗酵の間に失われる危険も回避される。それというのも生育有利性は形質転換されなかつた細胞によつては生じないからである。

場合により、宿主株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性を、この宿主細胞の栄養要求性もしくは薬剤感受性を相補う遺伝子1種以上を導入することにより克服することもできる。しかしその際に、所望の生産物の遺伝子を含有する宿主細胞を選択する簡単な可能性は認められない。

組換え体 DNA 分子には、酵母細胞を形質転換することができるかつ外来遺伝子を発現することのできるすべての組換え体 DNA 分子が該当する。この際に、例えばプラスミドの染色体外転写が該当するばかりでなく、所望の蛋白質の遺伝子をそれぞれ完全な発現カセット〔プロモーター、ターミネーター、調節遺伝子、転写増強遺伝子; *Transkriptionsverstärker* 等〕を含有する統合ベクター (Integrationvektor) 又は統合性 DNA フラグメントを介して酵母ゲノム中に取

イブリッド株を単離する。

それ故、本発明の他の優れた実施形では、組換え体 DNA 分子が所望の蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物の遺伝子に加えて、宿主株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性を相補う遺伝子1種又は数種を含有する。

本発明の優れた実施形により、形質転換された宿主細胞と形質転換されていない宿主細胞との簡単な区分が可能である。宿主株の栄養要求性及び/又は薬剤感受性1つ以上を相補う遺伝子の存在及び発現は、形質転換された細胞を、例えば宿主株自体が合成することのできないアミノ酸を含有していないが、組換え体 DNA 分子上にその遺伝子が存在している培地中에서도生育させることができる。これに対して、形質転換されていない、従つて組換え体 DNA 分子及びその上に含有されている栄養要求性相補性遺伝子を有していない宿主株はこのような培地中では生育し得ない。これにより、簡単に、形質転換された宿主細胞の選択を行なうことができ、そ

込みかつ酵母細胞の蛋白質と一緒に発現することもできる。このための前提は組換え体 DNA 分子及び染色体の酵母配列上の相向性の存在である。そのような相向性領域を介して、統合性 DNA フラグメントを公知方法により酵母染色体中に導入することができる。

それ故、本発明の他の優れた実施形では組換え体 DNA 分子はプラスミドあるいは統合ベクター又は統合性 DNA フラグメントである。プラスミドとしては、細胞中で高いコピー数で産出する酵母プラスミドが特に優れている。例えば、このような酵母プラスミドは酵母/E、コリーハイブリッドベクター ("シャトルベクター") であり、これは YRp, YEp, YIp 及び YCp として表わされる。YEp-及び YRp-プラスミドだけが細胞中で高いコピー数で産出する。これらのプラスミドは酵母染色体の複製とは関係なく該プラスミドの独立した複製を可能にする配列の存在に係つておりかつ一般に細胞1個当たりコピー5~40の個数で存在する。YIp プラス

ミドは酵母ゲノム中への統合によつて発現され得るに過ぎない。それ故、それは統合ベクターの例である。Yip プラスミドは $1/10$ の低い形質転換率を有するが、そのために YRp - 及び YEp プラスミドに比べて著しく高い安定性を有する。YRp - 及び YEp プラスミドは選択圧なしで細胞増殖の際に失なわれ得る〔 "Nature", 305, 391~397頁(1983年)〕。しかしそのような選択圧は、栄養要求性又は薬剤感受性の宿主株の融解を最小増地中で又は宿主株が感受性である一定の薬剤を含有する増地中で実施しかつ付加的に組換え体 DNA が栄養要求性又は感受性を相補う遺伝子1個又は数個を有する本発明の優れた実施形で生じる。

本発明により、相同性又は非相同性蛋白質又は蛋白質含有遺伝子生産物が高収率でかつ蛋白質分解作用をしない形で発現可能であり、その際また形質転換された細胞の選択並びにそれら所望の遺伝子生産物の収率を高めることも簡単に実施することができる。細胞を溶解する溶

ルゲンシス (Saccharomyces carlsbergensis) 菌株, TCY 2824-1A (α mal 18- Δ ura 3-52 his 4), DSM 4317 と交雑した。

引続いて、孢子形成を行ない、かつ生成した酵母分離体をその栄養要求性について種々の選択増地上で平板培養しかつプロテアーゼ欠損について細胞溶解物中でプロテアーゼ活性を測定することにより試験した。菌株 ABYSMAL 81 (ura 3-52 mal 18- Δ lys pra 1 prb 1 prc 1 prd 1 cps 1) 及び ABYSMAL 81 (ura 3-52 mal 18- Δ lys pra 1 prb 1 prc 1 cps 1) は次のようにして同定した：

プロテアーゼ欠損の検出

分離体を YEPD 増地 (酵母エキース 1%, ペプトン 2%, グルコース 2%) 5 ml 中で発育させ、対数増殖期乃至定常期早期の発育相の細胞を採取し、2回水で洗いかつガラスビーズを用いて回転ミックス (Whirlmix) で均質化することにより溶解する〔 "MGG", 145巻, 327~333頁(1976年)〕。細胞を 20 mmol

台及び公知方法により遺伝子生産物を取得する他の処理の場合にも、宿主細胞のプロテアーゼ欠損のために形成された生産物に対する蛋白分解作用は惹起されない。

本発明の優れた実施形において蛋白質の α -グルコシダーゼ PI が製造される (例4参照)。実施例

次に、本発明を実施例により詳説する。

例 1

サツカロミセス株 ABYSMAL 81 及び ABYSMAL 81 の製造に当り、プロテアーゼ A, B 及び D 並びにカルボキシペプチダーゼ Y 及び S が欠損しておりかつ付加的にアデニン-, ヒスタジン-及びリジン生合成における栄養要求性を有する一倍体のサツカロミセス・セレビシエ菌株 ABYSD-11 (a pra 1 prb 1 prc 1 prd 1 cps 1 ade lys his 7), DSM 4322 を、欠損 α -グルコシダーゼ構造遺伝子及びウランル-及びヒスタジン生合成における栄養要求性を特徴とするサツカロミセス・カールスベ

ルトリス (pH 7.0) 1 ml で抽出しかつ遠心分離後に上澄みを粗製エキースとして更に加工処理した。プロテアーゼの活性化のために粗製エキースを pH 5.0 に調整しかつ 25℃ で 24 時間恒温保持した。

プロテアーゼ A 欠損 (pra 1) の検出

細胞エキースによる 1.2% - 酸溶性ヘモグロビンの加水分解なし, pH 3.0〔 "Eur. J. Biochem.", 42, 621~629頁(1974年)〕

酸変性したヘモグロビン 1.2% を含有する 0.1 mol/l β -ラクトート緩衝液 (pH 3.0) 0.5 ml を細胞溶解物 0.1 ml と 25℃ で恒温保持した。30分後に、10% - トリクロロ酢酸 0.5 ml で反応を停止しかつ遠心分離後にトリクロロ酢酸可溶性生成物を 280 nm で吸光度測定するか又はマクドナルド及びチエン〔 McDonald 及び Chen 共著, "Anal. Biochem.", 10巻, 175~177頁(1965年)〕による変性フォリン測定より測定した。

比活性の計算に当つてザーメンホフ (Zamenhof) による蛋白質測定を行なつた〔"Methods Enzymol.", 3巻, 702頁(1957年)〕。

プロテアーゼA欠損は、酸変性ヘモグロビンに対する細胞溶解物の特異的な加水分解活性が野生型株に比べて5%より低い数値に低下した場合に認められる。

プロテアーゼB欠損 (prb 1) の検出

pH 7で細胞エキスによる2,4-アゾコル (Azocoll) の加水分解なし〔"Eur. J. Biochem.", 42巻, 621~626頁(1974年)〕

0.1 mol/l ホスフエート緩衝液 (pH 7.0) 中の2,4-アゾコル懸濁液 0.5 ml を細胞溶解物 0.1 ml と振盪下に 25°C で恒温保持した。

プロテアーゼBの活性化に当り粗製エキスに活性測定前にトナシル硫酸ナトリウム (最終濃度 0.25%) を加えた。

30分後に、反応を10% トリクロロ酢酸 0.5 ml の添加により停止しかつ遠心後、上澄み

7.0) 0.03 ml を 10 mmol/l Bz-Pro-Phe-Arg-NA (ジメチルスルホキシド中に溶解) 0.015 ml, アミノペプチダーゼM 10 μl (40 μg, 240 mU), 水 0.145 ml 及び粗製エキス 0.1 ml と混合し、かつ405 nm の吸光度変化を試薬管検体に対して測定した。

プロテアーゼDは、Bz-Pro-Phe-Arg-NA に対する加水分解比活性が野生型株に比べて10% よりも低い数値に低下した場合に欠損している。

カルボキシペプチダーゼY欠損 (prc 1) の検出

0.5 mmol/l ペンゾイル-L-チロシン-4-ニトロアニリド (pH 7) の細胞エキスによる加水分解なし〔"Arg. Biol. Chem.", 35巻, 658~666頁(1971年)〕

デオキシコレートで活性化した (最終濃度 0.5%) 粗製エキス 0.1 ml を 0.1 mol/l ホスフエート緩衝液 (pH 7.0) 1 ml 及び 3 mmol/l ペンゾイル-L-チロシン-4-ニトロアニリド (ジメチルスルホキシド中に溶解) 0.2 ml

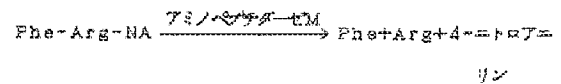
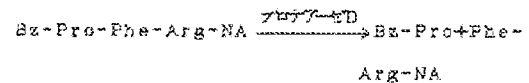
中の吸光度を 550 nm で測定した。

プロテアーゼBは、アゾコルに対する細胞溶解物の加水分解比活性が野生型株に比べて5%より低い数値に低下すると欠損している。

プロテアーゼD欠損 (prd 1) の検出

アミノペプチダーゼMの存在における 50 mmol/l トリス/マレエート緩衝液 (pH 7.0) 中で 0.5 mmol/l Bz-Pro-Phe-Arg-NA (ベンゾイル-L-プロピル-L-フェニルアラニル-L-アルギニル-p-ニトロアニリド) は細胞エキスにより加水分解されない〔"J. Biol. Chem.", 260巻, 4585~4590頁(1985年)〕

試験原理:



0.5 mol/l トリス/マレエート緩衝液 (pH

と 25°C で恒温保持した。10分後に 1 mmol/l 塩化水銀 1 ml で停止しかつ遊離した p-ニトロアニリンを 410 nm で測定した。

カルボキシペプチダーゼY欠損は、ベンゾイル-L-チロシン-4-ニトロアニリドに対する加水分解比活性が野生型株と比べて5%より低い数値に低下した場合に存在する。

カルボキシペプチダーゼS欠損 (cps 1) の検出

pH 7.4で細胞エキスによる Cbz-Gly-Leu (ベンジルオキシカルボニル-グリシル-L-ロイシン) の加水分解なし (次にL-アミノ酸オキシダーゼ-ペルオキシダーゼ試験で遊離ロイシンの分析) ("Eur. J. Biochem.", 73巻, 553~556頁(1977年))

試験溶液 (0.25 ml/l L-アミノ酸オキシダーゼ, 0.4 ml/l 西洋ワサビペルオキシダーゼ 及び 0.5 mmol/l MnCl₂) 0.5 ml, 27.5 mmol/l Cbz-Gly-Leu 溶液 (0.2 mol/l ホスフエート緩衝液, pH 7.0 中に溶解) 0.4

ml, o-ジアニシジンジヒドロクロリド(2mg/ml, H₂O中に溶解)0.05ml, 2,2 mmol/l βフェニルメチルスルホニルフルオリド0.05ml及び透析した細胞溶解物(透析:0.1モル塩化イミダゾール, pH 5.3; 24時間; 25℃)0.1mlを混合し405nmで吸光度変化を測定した。

カルボキシペプチダーゼY欠損は、Cps-*Gly-Leu*に対する加水分解活性が野生型株と比べて5%より低い数値に低下した場合に存在する。

前記の検出法に基づき、菌株ABYSDMAL 81ではプロテアーゼA, B, D及びカルボキシペプチダーゼY及びBが欠損し、かつ菌株ABYSMAL 81ではプロテアーゼA, B並びにカルボキシペプチダーゼY及びBが欠損していることが確認された。

マルトース有効化栄養要求性の検出

酵母培養ベース(YNB, 塩-ビタミン混合物, Difco)0.67%, カザミノ酸(CAA, 蛋白質

水解物, Difco)0.5%, マルトース(唯一のC源)2%, ウラシル20mg/l及びアデニン30mg/lを含有する合成完全培地I上で発育せず。

ウラシル栄養要求性の検出

YNB 0.67%, CAA 0.5%, グルコース(唯一のC源)2%及びアデニン30mg/lを含有する合成完全培地I上で発育せず。

リジン栄養要求性の検出

ウラシル(20mg/l)を含有するが、リジンを含有しない合成完全培地II(CAA 0.5%の代わりにリジンを含有しないアミノ酸混合物を使用した)上では発育せず。

ヒスタジン-及びアデニン原栄養性の検出

ウラシル(20mg/l)を含有するが、アデニン及びヒスタジンを含有しない合成完全培地(CAA 0.5%の代わりにヒスタジンを含まないアミノ酸混合物を使用した)上で発育。

例2及び3

サツカロミセス株ABYSD 91 (*leu* 2-3,

2-112 *trp* 1-289a *Fra* 1 *prb* 1 *prd* 1 *pre* 1 *cps* 1), ABYSD 106 (*ura* 3-52 *leu* 2-3, 2-112 *his* *pra* 1 *prb* 1 *prd* 1 *pre* 1 *cps* 1), ABYS 91 (*leu* 2-3, 2-112 *trp* 1-289a *pra* 1 *prb* 1 *pre* 1 *cps* 1)及びABYS 106 (*ura* 3-52 *leu* 2-3, 2-112 *his* *pra* 1 *prb* 1 *pre* 1 *cps* 1)を製造するに当り、例1に記載したように、サツカロミセス・セレピシエ菌株ABYSD-11をサツカロミセス・カールスベルゲンシス菌株DBY 746, DSM 4316と交雑させた。胞子形成後、酵母分離体をそのプロテアーゼ欠損及び栄養要求性について試験した。

ABYS 91及びABYSD 91について:

プロテアーゼ欠損の検出

例1参照

ロイシン-及びトリプトファン栄養要求性の検出

ウラシルを含有が、ロイシンもしくはトリプトファンを含まない合成完全培地II(0.5%

CAAの代わりにロイシンもしくはトリプトファンを含まないアミノ酸混合物を使用した)上で発育せず。

ウラシル-, アデニン-, ヒスタジン-及びリジン-原栄養性の検出

アデニン, ウラシル, ヒスタジン及びリジンを含有しない合成完全培地II(0.5% CAAの代わりにヒスタジン及びリジンを含有しないアミノ酸混合物を使用した)上で発育。

ABYS 106及びABYSD 106について:

プロテアーゼ欠損の検出

例1参照

ウラシル栄養要求性の検出

合成完全培地II上で発育せず。

ロイシン-及びヒスタジン栄養要求性の検出

ウラシルを含有が、ロイシンもしくはヒスタジンを含有しない合成完全培地II(0.5% CAAの代わりにロイシンもしくはヒスタジンを含まないアミノ酸混合物を使用した)上で発育せず。

アデニン、リジン及びトリプトファン栄養性の検出

フラシルを含有するが、アデニン、リジン及びトリプトファンを含有しない合成完全培地Ⅱ(0.5% CAAの代りにロイシン及びトリプトファンを含有しないアミノ酸混合物を使用した)上で発育。

例 4

α-グルコシダーゼPIの発現

サツカロミセス菌株AHYSMAL 81(例1)をプラスミドYEp/506b3で形質転換した["Nature", 275巻, 104~109頁(1978年)]。

このプラスミドの製造に当つて、ベクターYRp/OLUPI, DSM 4173 Pを制限エンドヌクレアーゼSap I及びHind IIIで消化し、約3.0 kbpの長さのSap I/Hind III-フラグメントを分離し、かつYEp 24からの分離Pvu II/Sap HI-ベクターフラグメント["Gene", 8巻, 17~24頁(1979年); Cold

Spring Harbor, "Symp. Quant. Biol.", 43巻, 77~90頁(1979年); "Gene", 29巻, 113~124頁(1984年); "Nature", 286巻, 860~865頁(1980年)]中にタレノウポリメラーゼでHind IIIの突出3'-末端を充填しかつSph I制限切断位所の突出3'-末端を分解後一連精した。生成したプラスミドYEp/S4中でα-グルコシダーゼPI発現カセットが平行配向(gleichlaufige Orientierung)でタータクマーゼ遺伝子に統合している。その後、YEp/S4のBam HI-制限切断位所中に、MAL 2-80p-遺伝子を含有する長さ約3.1 kbpのBam HI-フラグメントが連絡した。そのためにプラスミドpRM2, DSM 4314 Pを制限エンドヌクレアーゼBam Iで消化し、突出3'-末端をタレノウポリメラーゼで満たし、Bam HIリンカー[α(CGGGATCCCCG)]を挿入し、Bam HIで後から脱離しかつ長さ3.1 kbpのMAL 2-80p-遺伝子を含有するBam HIフラグメントを分離

する。この生成ベクターをYEp/506b3と表わした。

形質転換した菌株をマルトース4%を含有するYEP培地(酵母エキス1%, ペプトン2%)中で生育させかつ後期対数期もしくは定常期まで培養した。引続いて、バイオマスを採取しかつ10 mmol/l-ホスファート緩衝液(pH 6.8)で洗浄した。YEP培地5 ml(酵母約0.1~0.2 g, 湿式重量)からの細胞を回転ミックス(Whirlmix)で均質化することにより破碎した["MOG", 145巻, 327~333頁(1976年)]。

α-グルコシダーゼ比活性の測定はp-ニトロフェニル-α-D-グルコピラノシドの加水分解["MOG", 151巻, 95~103頁(1977年)]及びザーメンホフによる蛋白測定["Methods Biochem.", 3巻, 702頁(1957年)]に基づいて行なつた。

このようにして得られた粗製エキス中でその酵素は4°Cで10日以上安定であつた。SDSゲ

ル電気泳動でもこの期間は大分子パターンの変化は認められなかつた。このことは、この上澄み中に含まれる他の酵素及び蛋白質もこの酵母株中で安定しておりかつ著しくは蛋白質分解作用を受けないことを示す。

表1中で、パン酵母(Deutsche Hefewerke Nürnberg, DHW)のα-グルコシダーゼの酵素安定性をプロテアーゼが欠損しているα-グルコシダーゼ形質転換体中の細胞発現させたα-グルコシダーゼの安定性と比較して掲載した。パン酵母ではα-グルコシダーゼ比活性は対数期後期乃至定常期早期で最大になる。細胞が更に進行するとα-グルコシダーゼ比活性は著しく低下する(表1)。これとは反対に、定常発育期に達した後でもプロテアーゼが欠損している形質転換されたmal 0菌株は安定して蓄積されて腐蝕的であり、それ故バイオマスの洗浄及び後処理は著しく簡便になる。

懸酵培地:

パン酵母: 1%酵母エキス, 2%ペプトン,

2 % マルトース

ABYSMAL 81 : 合成完全培地Ⅱ

例 5

α-グルコシダーゼのN末端部とHIV1抗原とより成る融合蛋白質をプロテアーゼ欠損酵母株中で発現させる。

α-グルコシダーゼPI発現ベクターYEpl5C6b3(例4)中で、α-グルコシダーゼPIの約80番をコード付けする長さ1.4 kbpのEgIIフラグメントをHIV1-レトロウィルスのgp41膜蛋白質の一部をコード付けする長さ約300 bpのDNAフラグメントに対して交換した。そのため、長さ約300 bpのBamHI/HindⅢ-フラグメント(配列: "Cca22", 45巻, 637~648頁(1986年)の第1図の1638~1943のWMJ-1の配列参照)をHincII及びHindⅢで消化したE. コリベクターpUC18[4.13 mp 18及びpUC19, 配列: "Gene", 33巻, 103~119頁(1985年)]中にサブクローニングした(構

造: pUC18RRH.300)。pUC18RRH.300から長さ約320 bpのBamHI/HindⅢ-フラグメントを分離し、長さ約5.2 kbpのpUR278-BamHI/HindⅢ-ベクターフラグメント中に連結した(配列: "EMBO", 2巻, 1791~1794頁(1983年))(構造: pUR278RRH.300)。プラスミドpUR278RRH.300をHindⅢで消化し、突出5'末端を"クレノウポリメラーゼ"で満たし、BamHI-リンカー[α(GGGATCCC)]を挿入する。その後、BamHIで脱離し、長さ約300 bpのBamHIフラグメントを分離し、長さ約1.1 kbpのYEpl5C6b3-EgII-ベクターフラグメント中に連結した。gp41-膜ポリペプチド-DNAの正しい配向で、α-グルコシダーゼのN末端(アミノ酸50個)、融合部位に構造を条件とするアミノ酸4個、gp41-膜蛋白質のアミノ酸101個及び(末端に構造を条件とするアミノ酸3個より成り、分子量約18500Dの融合蛋白質が生成する。所望の構造物は形質転換し、培

養した(下記参照)後のプロテアーゼ欠損酵母発現株ABYSMAL 81中の発現融合蛋白質を介して、次いでSDSゲル電気泳動及びウエスタンブロットを行なつてヒトHIV1血清との免疫反応に基づいて分離した。融合蛋白質は全蛋白質の約5%で発現し、ターマシー染色後にSDSポリアクリルアミドゲル中の變性バンドとして観察することができた。

α-グルコシダーゼPI-gp41融合蛋白質を発現するために、形質転換体をグルコース2%及びマルトース2%を含有する選択培地(YNB 0.67%, CAA 0.5%, アデニン30 mg/l)上で発育させた。10~20時間の誘導期後(グルコース消費後)細胞を採取した。

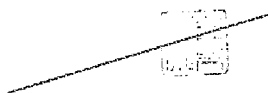


表 1

マルトース 2 % を含有する完全培地中のパン酵母と最少培地 (YNB 0.6 7 % , CAA 0.5 % , アデニン 3 0 mg / l 及びグルコース 2 %) 中のプロテアーゼ欠損形質転換体 ABYSMAL 8 1 - 5C6b3 との発酵中の α -グルコシダーゼ活性 (mU / 液白濁等) と比較

発酵時間 菌株	0 時間		3 時間 15 分		6 時間 5 0 分		2 4 時間		3 6 時間			
	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.		
パン酵母 (DHW-Deutsche Hefewerke Nürnberg)	3.5	1250	-	-	15	1600	25	1530	25	400		

ABYSMAL81 - 5C6b3	5 時間		1 0 時間		1 5 時間		2 0 時間		3 0 時間		5 0 時間	
	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.	OD ⁵⁰⁰	α -Gluc.
	1.4	1600	9	3800	17	7500	21	8800	25	9800	26	9800

第 1 頁の続き

⑤ Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号
C 12 N 1/18		7421-4B
15/81		
// C 12 N 9/26	Z	7823-4B
(C 12 P 21/00		
C 12 R 1:865)		

優先権主張	⑥ 1988 年 2 月 17 日 ⑦ 西ドイツ (DE) ⑧ P3804890.6
⑫ 発 明 者	エアハルト・ゴベツツ キー ドイツ連邦共和国トウツイング・トラウビンガー・シュトラーセ 60
⑬ 発 明 者	ギユンター・シユーマ ツハー ドイツ連邦共和国ベルンリート・カペレンシュトラーセ 20